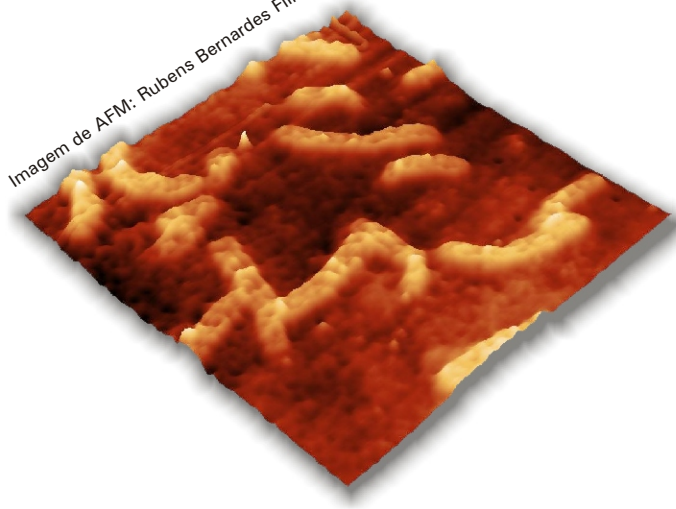


Coleta de material de cromossomos utilizando microscópio de força atômica

Imagem de AFM: Rubens Bernardes Filho



Rubens Bernardes Filho¹
Stefan Thalhammer²

Nos últimos anos a nanotecnologia se tornou fundamental para desenvolvimento de novos produtos e metodologias. Devido ao seu potencial para o desenvolvimento de novas aplicações, nos deparamos com seus avanços nos mais diferentes campos de aplicação, desde a produção de tintas menos poluentes (GALEMBECK et al., 2006) até aplicações em fármacos com liberação controlada. Estes avanços servem de exemplo do potencial contido nas novas nanotecnologias.

Hoje existe forte demanda para o desenvolvimento e adaptação de métodos de preparação de amostras de origem biológica para uso em microscopia de força atômica. Particularmente a preparação de amostras contendo cromossomos é uma demanda importante devido à possibilidade de remoção de partes de cromossomos para uso em biologia molecular.

Instrumento extremamente versátil para aplicações em nanotecnologia o microscópio de força atômica (MFA) pode ser utilizado não só para visualizar superfícies em escala nanométrica, como também para manipular materiais de origem biológica como os cromossomos (FRITZSCHE et al., 1997). Neste comunicado é apresentada metodologia de retirada de material genético de cromossomos (dissecção).

Existem vários protocolos de preparação de cromossomos de origem animal e vegetal para uso em microscopia óptica e eletrônica (BONIFACINO et al., 2005). Os trabalhos existentes, realizados com cromossomos de outras origens sempre utilizam solventes que

impossibilitam o uso do material genético isolado para outros fins como por exemplo transferência genética.

Preparação dos cromossomos

Para preparação das amostras de cromossomos foram utilizados linfócitos cultivados em plasma bovino contendo 1% de antibiótico, composto da mistura de streptomicina/penicilina, por ao menos 72 horas a 37°C. Quando observadas metáfases as células foram tratadas com Colcemid para parar o processo de desenvolvimento, preservando o estado de metáfases. A amostra foi então centrifugada com solução hipotônica de KCl (0,075M). As metáfases foram fixadas por gotejamento em lâminas de microscópio e secas ao ar e desidratadas com etanol (70%).

A descontaminação do cantilever foi feita por exposição a radiação ultravioleta por ao menos 40min antes da realização dos procedimentos.

Para realizar os procedimentos de retirada de material dos cromossomos foram utilizados cantileveres normalmente utilizados para medidas em modo contato intermitente Nanosensors ("Tapping mode" TM Veeco Co.) com constante de mola típico de 45N/m.

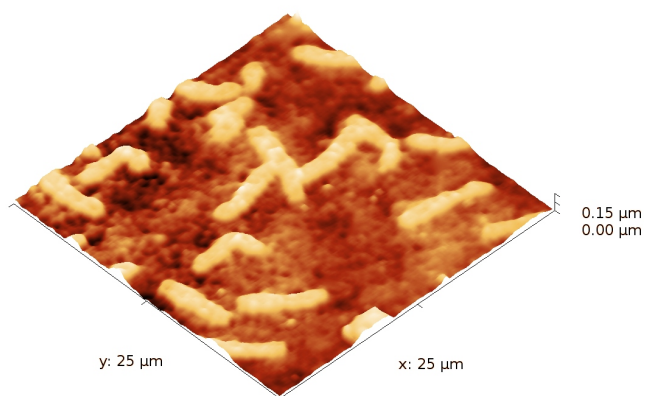
Para se obter imagens de material de origem biológica com MFA é normalmente são normalmente empregados os modos de contato intermitente ou não-contato. Estes modos de trabalho se caracterizam por exercer menos força sobre as amostras durante o

¹Físico, Dr., Pesquisador, Embrapa Instrumentação Agropecuária, Caixa Postal 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP, e-mail: rubens@cnpdia.embrapa.br

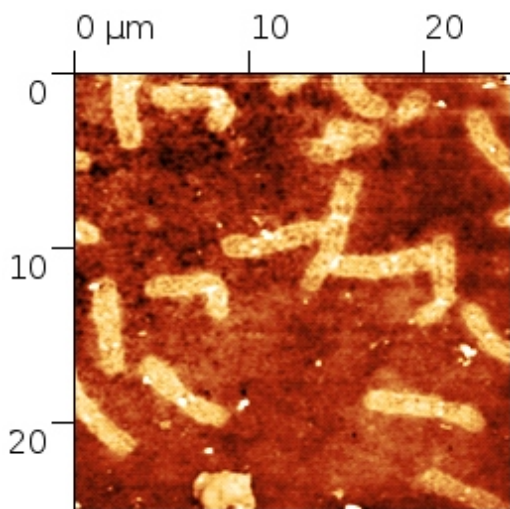
²Biólogo, Pesquisador do Centro de Nanociências da Universidade Ludwig Maximilian Munique - Alemanha

processo de aquisição da imagem (SCHABERT; RABE, 1996).

As Fig. 1a e 1b apresentam um exemplo de imagem de amostra de cromossomos depositado em vidro obtidas com microscopia de força atômica. Após a sua localização, utilizando microscópio invertido sob o qual foi montado o microscópio de força atômica as imagens foram obtidas em modo não-contato para evitar contato do cantilever (sonda do microscópio de força atômica) com a amostra em estudo.



(a)



(b)

Fig. 1. Amostra de cromossomos depositados sobre lâmina de vidro. (a) visão tridimensional e (b) visão bidimensional da mesma varredura (visão de topo).

Nas imagens de microscopia de força atômica padronizou-se atribuir cores mais claras a estruturas mais elevadas, ou seja o ponto mais alto da imagem recebe a cor branca e a região mais baixa coloração mais escura chegando ao preto no nível mais baixo da imagem.

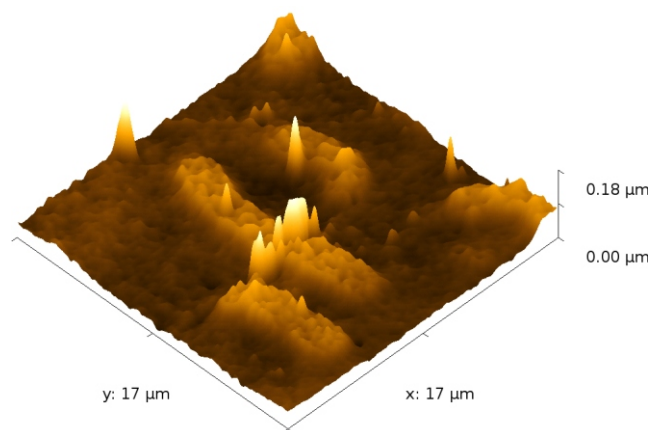
O microscópio de força atômica utilizado para os procedimentos foi montado dentro uma capela com fluxo laminar com lâmpada de UV, para evitar possível contaminação dos materiais manipulados. Para realizar estes procedimentos foram utilizados microscópios de força atômica modelos Explorer (Veeco) e Bioprobe (Park).

As primeiras imagens dos cromossomos foram obtidas em modo não-contato. Uma vez definida a região de onde seria retirado o material foram realizadas mais

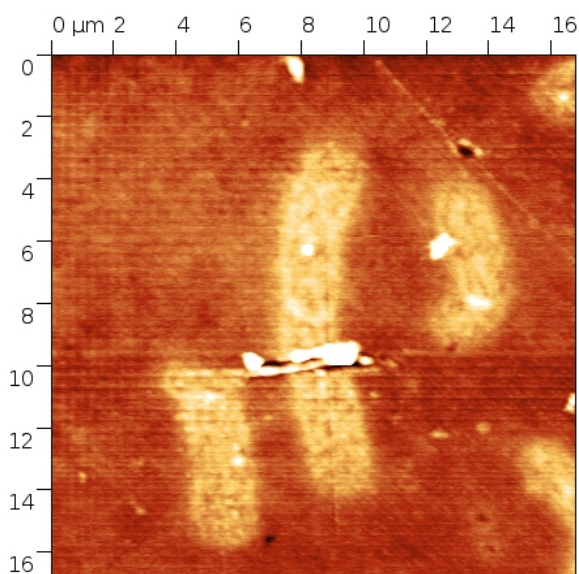
varreduras para se assegurar do correto posicionamento da amostra e campo de varredura e se evitar quaisquer deslocamentos devido a erros de posicionamento ou "thermal drift".

Quando se trabalha em modo não contato as imagens obtidas apresentam resolução inferior a aquelas obtidas nos modos contato e "Tapping" (contato intermitente). Entretanto a resolução é suficiente para identificar os cromossomos, que são consideradas estruturas grandes para esta técnica microscópica.

Uma vez definidos a região e quanto de material será retirado o modo não-contato é desligado e passa-se a utilizar modo contato durante as varreduras. Nesta situação se ajusta o sistema de controle do MFA para que o cantilêver pressione a amostra durante as varreduras, dessa forma retirando material durante o seu deslocamento. A Fig. 2 apresenta duas imagens de microscopia de força atômica dos cromossomos depositados sobre lâmina de vidro, obtidas em modo não-contato, após a retirada de material, usando o procedimento descrito. A imagem (a) é uma representação tridimensional e a imagem (b) uma visão de "topo".



(a)



(b)

Fig. 2. Região onde foi realizado o procedimento de retirada do material genético. (a) imagem tridimensional e (b) bidimensional (visão de topo).

Uma vez coletado o material fica aderido à agulha o que pode ser evidenciado por microscopia eletrônica de varredura (Fig. 3).

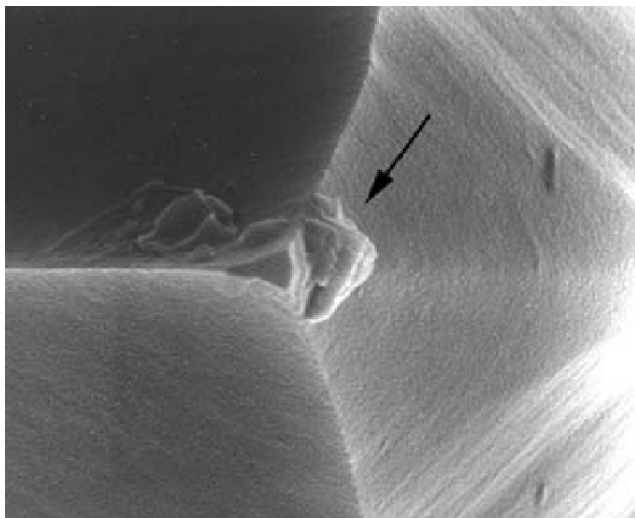


Fig. 3. Imagem de microscopia eletrônica de agulha utilizada no procedimento de retirada de material genético de amostra de cromossomos.

O cantiléver com o material coletado poder ser amplificado usando técnicas correntes de biologia molecular, tais como PCR (do inglês: Polymerase chain reaction).

A possibilidade de aplicação desta técnica a produtos de origem agropecuária pode produzir resultados em várias linhas de pesquisa tais como, estudo de resistência a pragas, transferência de material genético, seqüenciamento de fragmentos de DNA e etc. Visto que existe a possibilidade de se retirar material de regiões bem definidas dentro do cariótipo em estudo.

Referências

BONIFACINO, J. S. et al. **Current protocols in cell biology**. Hoboken: Jon Wiley & Sons, 2005. 2930p.

FRITZSCHE, W.; TAKAC, L.; HENDERSON, E. Application of Atomic Force Microscopy to Visualization of DNA, Chromatin, and Chromosomes. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, [S. l.], v. 7, e. 3, p. 231-240, 1997.

GALEMBECK, F.; SILVA, M. C. V. M.; ROSSETO, R.; PINHEIRO, G. O.; BRITO, J. DE. Biphor - nanotechnology for waterborne paint improvement. **Paint & Coatings Industry**, [S. l.], v. 1, p. 56-62, 2006.

SCHABERT, F. A.; RABE, J. P. Vertical Dimension of Hydrated Biological Samples in Tapping Mode Scanning Force Microscopy. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 70, p. 1514-1520, 1996.

Comunicado Técnico, 75

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária
Rua XV de Novembro, 1542 - Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: 16 3374 2477
Fax: 16 3372 5958
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br
www.cnpdia.embrapa.br

1a. edição
1a. impressão 2006: tiragem 300

Comitê de Publicações

Presidente: Dr. Carlos Manoel Pedro Vaz
Membros: Dra. Débora Marcondes B. P. Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso

Membro Suplente: Dr. Paulo S. P. Herrmann Junior

Expediente

Revisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento das ilustrações: Valentim Monzane
Foto da capa: Rubens Bernardes Filho
Editoração eletrônica: Valentim Monzane